

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



IB | 04 | 4407

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 52 977.2

Anmeldetag:

13. November 2003

Anmelder/Inhaber:

H3 Pharma Inc., Montréal, Quebec/CA

Erstanmelder: Professor Dr. Heinz Vollmers,
97084 Würzburg/DE; Professor Dr. Hans Konrad
Müller-Hermlink, 97084 Würzburg/DE.

Bezeichnung:

Muriner anti Idiotyp-Antikörpers oder anti Idiotyp-Anti-
körper aus der Ratte des humanen monoklonalen
SC-1 Antikörpers

IPC:

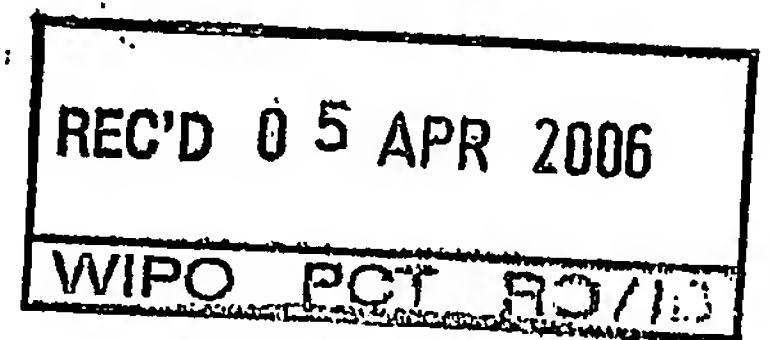
C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. März 2006
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stemme

Stemme





Muriner anti Idiotyp-Antikörpers oder anti Idiotyp-Antikörper aus der Ratte des humanen monoklonalen SC-1 Antikörpers

5 Die Erfindung betrifft einen aus der Maus oder aus der Ratte gewonnenen anti Idiotyp-Antikörper. Des weiteren sieht die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des anti Idiotyp-Antikörpers sowie verschiedene Verwendungen des anti Idiotyp-Antikörpers vor.

Hintergrund der Erfindung

10 Der Bekämpfung von Tumoren mit Hilfe humaner monoklonaler Antikörper wird eine großes Potential zugemessen. Diese Antikörper behindern das weitere Wachstum von Krebszellen oder nehmen Einfluß auf die biologische Steuerung der Krebszellen und leiten dabei deren
15 Absterben (Apoptose) ein. Die Herstellung dieser humanen monoklonalen Antikörper basiert auf der Isolierung von Antikörpern, die Bestandteil der Immunantwort von Krebspatienten sind. Mit Hilfe der sogenannten Hybridomtechnik gelingt es, den Antikörper in größeren Mengen und vor allem in monoklonaler Form zu erhalten.

20 Durch den Einsatz der Hybridomtechnik gelang bereits vor einiger Zeit die Gewinnung des humanen monoklonalen Antikörpers SC-1, einem IgM-Antikörper, der spezifisch mit Magenkarzinomzellen reagiert und ohne Schädigung gesunder Zellen, sowohl *in vitro* als auch
25 *in vivo*, gezielt Apoptose von Tumorzellen induziert (Vollmers et al., Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer, Oncology Reports 5: 35-40, 1998).

30 Der Einsatz des Hybridomverfahrens zur Generierung bestimmter anti Idiotyp-Antikörpern ist ebenso aus dem Stand der Technik be-

kannt. Verfahrensbedingt hängt die Schaffung anti Idiotyp-Antikörper exprimierender Hybridomzellen wesentlich mit von der Verfügbarkeit entsprechend immunisierter B-Lymphozyten bzw. von der Verfügbarkeit der zur Immunisierung verwendeten Substanz ab. Naturgemäß ist bereits die Identifikation und Charakterisierung einer zur Immunisierung geeigneten Substanz, wie z.B. der humane monoklonale SC-1 Antikörper, mit großem Aufwand verbunden, dazu gehört unter anderem das Auffinden einer geeigneten Myelomzelle als Fusionspartner für die B-Lymphozyten.

Definitionen und Begriffe

„Antikörper“ sind Immunglobulin (Ig)-Moleküle, die jeweils zwei identische leichte und zwei identische schwere Ketten aufweisen und durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede der Ketten enthält eine Region von etwa 110 Aminosäuren mit variabler Sequenz, während der verbleibende Rest jeder Kette einen Bereich mit konstanter Sequenz aufweist. Die variablen Regionen von leichter und schwerer Kette ihrerseits umfassen jeweils mehrere hypervariable Regionen, welche für die Bindung der Antigene verantwortlich sind. Die spezielle Ausbildung der hypervariablen Regionen, die auch als complementarity-determining regions bezeichnet werden, bestimmen die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers. Die einen Antikörper aufbauenden funktionellen Fragmente werden abgekürzt mit V_L , V_H , F_V , F_C , Fab , Fab' , and $F(ab')_2$ bezeichnet.

Die „Hybridoma-Technik“ ist ein Verfahren, das die Herstellung monoklonaler Antikörper, insbesondere auch humaner monoklonaler Antikörper, ermöglicht. Das Verfahren beruht auf der *in-Vitro*-Gewinnung von zellulären Hybriden, die durch Zellfusion von normalen Lymphozyten mit unbegrenzt lebens- und teilungsfähigen Myelomzellen gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-

Zellen weisen die Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dementsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper zu produzieren, und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen (Köhler, Millstein, Nature 1975, Vol 256, 495).

Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her, dessen Spezifität von der ursprünglichen Lymphozyten-Zelle bestimmt wird. Die Hybridom-Zellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren. Monoklonale Antikörper, welche spezifisch an Antigene von Tumoren binden, eröffnen daher vielversprechende Möglichkeiten für Diagnose und Therapie von Tumorzellen.

Unter „Idiotypie“ versteht man die genetisch bedingte Variantenbildung von intramolekularen Strukturen in der variablen Regionen von Immuno-Globulinen, wobei die genaue genetische Basis der idiotypischen Variabilität ist nur teilweise aufgeklärt ist. Idiotypische Variationen betreffen die Aminosäuresequenz und Proteinstruktur (sog. Determinanten) insbesondere im Bereich der, auch als Idiotop bezeichneten, Antigen-Bindungsstelle. Der Begriff „Idiotyp“ bezeichnet den vollständige Satz der Determinanten einer variablen Region eines Antikörpermoleküls.

Bei den individuell auftretenden Idiotypen handelt es sich um Aminosäuresequenzen, die in der Regel spezifisch für alle von einem B-Lymphozyten gebildeten monoklonalen Antikörpern sind.

Beschreibung der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht vor dem beschriebenen Hintergrund in der kostengünstigen Schaffung eines Stoffes, der den Nachweis des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers im Rahmen biochemischer Experimente, pharmakologischer Tests und/oder in der Labordiagnose erlaubt. Darüber hinaus ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Stoffes als Vakzin vorgesehen.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein anti Idiotyp-Antikörper generiert, der dadurch gekennzeichnet ist, dass der anti Idiotyp-Antikörper

- den humanen monoklonalen SC-1-Antikörper oder
- Fragmente des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers spezifisch bindet.

Der erfindungsgemäße anti Idiotyp-Antikörper wird als anti SC1-Idiotyp-Antikörper bezeichnet, wobei der aus der Maus gewonnene anti SC-1-Idiotyp-Antikörper auch als muriner anti SC-1-Idiotyp-Antikörper bezeichnet werden kann.

Der Kerngedanke der Erfindung besteht in der Generierung eines anti SC-1-Idiotyp-Antikörpers, der die Bindungsstelle des Rezeptors für den humanen monoklonalen SC-1 Antikörper imitiert (engl.: „mimicing“) und diesen spezifisch bindet. Aufgrund der spezifischen Bindung eignet sich der anti SC-1-Idiotyp-Antikörper für den Nachweis des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers im Rahmen biochemischer Experimente, pharmakologischer Tests oder bei der Labordiagnose. Zu diesem Zweck werden humane monoklonale SC-1 Antikörper für die Immunisierung von Mäusen oder Ratten verwendet, deren B-Lymphozyten mit Myelomzellen der Maus oder der Ratte zu einer unsterblichen Hybridomzelle fusioniert werden. Vor-

teilhafter Weise erhält man so eine unsterbliche und kostengünstig kultivierbare Hybridomzelle, die den anti SC-1Idiotyp-Antikörper exprimiert.

5

Eine weitere Eigenschaft des erfindungsgemäßen Stoffes ist die spezifische Bindung des anti SC-1-Idiotyp-Antikörpers an CD5 positive B-Lymphozyten.

10

Die im nachfolgenden Verfahren gewonnene Hybridomzelle, die den anti Idiotyp-SC-1-Antikörper exprimiert, d.h. hergestellt wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig am 6. November 2003 unter der Bezeichnung 6/22-10-30-13 hinterlegt.

15

Generierbar ist der erfindungsgemäße anti Idiotyp-SC-1-Antikörper durch ein Verfahren, das durch Einsatz entsprechender Hybridom-Zellen erster Generierung, hergestellt durch Fussion von B-Lymphozyten mit Myelom-Zellen erster Generierung, wobei die kultivierten Hybridom-Zellen erster Generierung jeweils monoklonale humane IGM Antikörper exprimieren; das Verfahren zur Generierung des anti SC1-Idiotyp-Antikörpers ist **dadurch gekennzeichnet**, dass

20

- die flüssigen Überstände der kultivierten Hybridom-Zellen erster Generierung zur Isolation der monoklonalen humanen IgM-Antikörper gereinigt werden,

25

- Mäuse oder Ratten mit dem gereinigten monoklonalen humanen IgM-Antikörper immunisiert werden,

- die für die nachfolgende Generierung isolierten B-Lymphozyten der bis zu vier Tagen nach der letzten Immunisierung getöteten Mäuse oder Ratten isoliert werden,

30

- die isolierten B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit Myelomzellen der Maus oder der Ratte unter Bedin-

gungen in Kontakt gebracht werden, die zu einer Fusion führen aus der die Hybridom-Zellen der nachfolgenden Generierung hervorgehen

- die Hybridomzellen der nachfolgenden Generierung kultiviert werden,
- die flüssigen Überstände der monoklonalen Hybridom-Zellenkulturen der nachfolgenden Generierung nach bestimmter Inkubationszeit auf die Anwesenheit von idiotypen Ig-Antikörpern getestet werden,
- die in den flüssigen Überständen der kultivierten Hybridom-Zellen der nachfolgender Generierung enthaltenen idiotypen Ig-Antikörper-auf ihre spezifische Bindung an den von den Hybridomzellen erster Generierung expremierten humanen monoklonalen Antikörper getestet werden, und
- die in den flüssigen Überständen der kultivierten Hybridom-Zellen der nachfolgenden Generierung enthaltenen idiotypen Ig-Antikörper-auf ihre spezifische Bindung an verschiedene IgM-Antikörpern hin untersucht werden.

20

Wenn im genannten Verfahrensprotokoll Zellen als „Zellen erster Generierung“ und als „Zellen nachfolgender Generierung“ bezeichnet werden, so ist für den Fachmann klar, dass damit vorhergehende und nachfolgende Zellgenerationen gemeint sind. Die Wahl der Wörter „erster“ und „nachfolgender“ bezieht sich nicht auf ein bestimmtes Alter oder eine bestimmte Passagenzahl der Zellen, sondern soll lediglich den Zeitrang der im Verfahren eingesetzten Zellen kennzeichnen.

25

30

In einer Weiterbildung des Verfahrens werden die B-Lymphozyten erster Generation, die humanen Ursprungs sind, aus einem lymphathischen Organ wie der Milz oder des Lymphknotens eines Kar-

zinompatienten entnommen. Die für die Herstellung des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers verwendeten B-Lymphozyten, wurden aus den Milzzellen eines Patienten mit Siegelringzellkarzinom des Magens gewonnen. Die B-Lymphozyten aus der Milz dieses Patienten wurden mit Heteromyelomzellen SPM 4-0 fusioniert. Alternativ ist auch die Gewinnung der B-Lymphozyten aus dem Blut eines Karzinompatienten denkbar.

Die im Rahmen des Verfahrens verwendeten Hybridomzellen erster Generierung exprimieren den humanen monoklonalen SC-1-Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon. Entscheidend dabei ist, dass die Aminosäuresequenz der durch die Hybridomzellen erster Generierung exprimierten SC-1-Antikörper substantiell mit der bekannten Aminosäuresequenz des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers übereinstimmt. Die Aminosäuresequenz des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers lässt sich der nachfolgend genannten Veröffentlichung entnehmen: (Vollmers et al., Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer, Oncology Reports 5: 35-40, 1998).

Es ist durchaus denkbar, dass die von den Hybridomzellen erster Generierung exprimierten Aminosäuren nur Teilen des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers entsprechen. Als funktionelle Fragmente des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers kommen die einen Antikörper aufbauenden Gruppen V_L , V_H , F_v , F_c , Fab , Fab' , $F(ab')_2$ in Frage.

Es liegt im Rahmen des zur Gewinnung des erfindungsgemäßen Stoffes angewandte Verfahren, dass zur Reinigung der Hybridomüberstände erster Generierung die verschiedenen dem Fachmann

bekannten Reinigungsverfahren für Polypeptide eingesetzt werden. Infrage kommen z.B. die Affinitätschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie oder die Gelfiltration. Natürlich ist auch eine Kombination der genannten Reinigungsverfahren in aufeinanderfolgender Reihenfolge denkbar. Mit der Reinigung ist naturgemäß auch eine Konzentrierung des Stoffes verbunden. Im Grunde genommen kann im Zusammenhang mit dem genannten Reinigungsverfahren auch von einer Isolation des humanen monoklonalen Antikörpers gesprochen werden. Es versteht sich von selbst, dass die Reinigung der IgM-Hybridom-Überstände erster Generierung den zur Immunisierung der Tiere vorgesehenen humanen monoklonalen SC-1-Antikörper in seinen Immunisierenden Eigenschaften nicht wesentlich verändern dürfen und im wesentlichen der Aminosäuresequenz des SC-1-Antikörpers in der veröffentlichten Form entsprechen.

Im allgemeinen erfolgt Immunisierung dann, wenn die B-Lymphozyten mit der immunisierenden Substanz in Kontakt kommen. Im vorliegenden Verfahren wird dieser Kontakt vorzugsweise durch intraperitoneale Injektion des gereinigten humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers hergestellt. Alternativ könnte die Immunisierung auch durch intravenöse Injektion oder *in vitro* direkt an isolierten B-Lymphozyten erfolgen.

Für den Fachmann ist selbstverständlich, dass die Immunisierung nach einem festgelegten Schema erfolgt. Die Vorgaben zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit im Rahmen der Immunisierung sind aus der Fachliteratur bekannt. Zur Gewinnung der B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung werden die Mäuse oder Ratten im vorliegenden Verfahren bis zu vier Tagen nach der letzten Immunisierung getötet.

Zur Gewinnung muriner anti Idiotyper-SC-1-Antikörper werden vorzugsweise BALB/C Mäuse mit gereinigtem humanen monoklonalen SC-1-Antikörper Immunisiert. Die aus diesen Mäusen isolierten B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung werden mit NS/O Myelomzellen in Polyethylenglykol fusioniert. Bevorzugt wird die Verwendung von PEG-1500. Grundsätzlich ist denkbar, dass die Zellfusion alternativ durch die dem Fachmann bekannte Elektrostimulation (mit Hilfe eines Fusionsgenerators) erfolgt.

Es versteht sich von selbst, dass zur Gewinnung von anti Idiotyp-Antikörpern der Ratte die aus der Ratte gewonnenen B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit Myelomzellen einer Ratte fusioniert werden.

Die flüssigen Überstände der herangewachsenen Hybridomzellen einer nachfolgenden Generierung werden unter Einsatz der dem Fachmann bekannten ELISA Technik auf die Anwesenheit von Ig Antikörpern getestet. Mit Ig Antikörper sind hier IgM, IgA und IgG-Antikörper gemeint. Der Test erfolgt nach ca. 3 Wochen.

Der erfindungsgemäße anti Idiotyp-SC-1-Antikörper lässt sich zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen einsetzen. Denkbar ist auch der Einsatz zur Durchführung der dem Fachmann bekannten FACS-Analysen mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters.

Insbesondere lässt sich der erfindungsgemäße Antikörper zur Identifikation CD-5 positiver B-Lymphozyten einsetzen.

In kommerzieller Hinsicht besonders interessant ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Antikörpers zur Durchführung pharmakokineti-

scher Tests, z.B. der Einsatz des erfindungsgemäßen Antikörpers zum spezifischen Nachweis des SC-1-Antikörpers im Blut.

5 Da der anti Idiotyp SC-1-Antikörper die Bindungsstelle des SC-1-Antikörper spezifischen Rezeptors imitiert, ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Antikörpers zur Auffindung von Substanzen (z.B. Antikörper und aktiver chemischer Verbindungen mit dem Potential zur Herstellung eines Arzneimittels) im Hochdurchsatz – Screening denkbar, die SC-1 ähnliche Bindungseigenschaften aufweisen. In
10 Zell-Testsystem könnten unter Verwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers Substanzen getestet werden, die eine ähnliche Wirkung wie der humane monoklonale SC-1-Antikörper haben.

15 Weiterhin ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Antikörpers zur Vakzination denkbar, da der anti SC-1-Idiotyp-Antikörper das tumorspezifische Antigen imitiert (Mimiking) welches der Antikörper SC-1 erkennt.

Material und Methoden

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

- 5 - ELISA-Platte vorbeschichten mit dem Primärantikörper (10µg/ml gereinigter SC-1 Antikörper verdünnt in PBS)
- 50 µl pro well
- ELISA-Platte abdecken und über Nacht bei 4°C lagern
- am nächsten Tag ELISA-Platte 2 x mit PBS waschen
- 100 µl RPMI-1640 (mit 10%FCS) pro well und für 1h bei RT stehen lassen
- 10 - 2 x mit PBS/0,05%Tween waschen
- 50 µl RPMI-1640 als Negativkontrolle (2 wells, Doppelbestimmung)
- 15 - 50 µl der Proben (2 wells, Doppelbestimmung) nebeneinander pipettieren
- 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 20 - 50 µl des Sekundärantikörpers (Peroxidase konjugiert) pipettieren (Peroxidase konjugierter rabbit anti mouse Ig 1:2000 in PBS/Tween)
- 1h mit im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 25 - 1 x mit PBS/0,05%Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit Citratpuffer waschen
- zum Auswerten: OPD Tablette (Dako, Hamburg) in Citratpuffer lösen + H₂O₂ (3 ml Citratpuffer + eine Tabl. + 5 µl H₂O₂)
- 30 - 50 µl Farbstoff in jedes Well pipettieren

- bei positiver Reaktion (gelbe Färbung) mit 10 μ l 3 M H_2SO_4 stoppen

5

Immunoperoxidasefärbung

- Kryokonserviertes Gewebe schneiden (4 μ m)
- Objektträger nach dem Schneiden mindestens 2h trocknen lassen
- Objektträger 10 min in Aceton stellen
- 30 min trocknen lassen
- 3 x mit Tris/NaCl waschen und anschließend 5 min in Tris stehen lassen
- mit 100 μ l Milchpulver (5 % in PBS) absättigen für 15–30 min.
- in Tris/NaCl tauchen
- 100 μ l des jeweiligen 1. Antikörpers: anti Idiotyp Antikörper (Hybridomüberstand unverdünnt)
 - für Negativkontrolle RPMI-1640/10%FCS
 - für Positivkontrolle CK8 1:50 mit BSA/PBS oder CAM 5.2 1:10 mit BSA/PBS (BSA 0,5 % in PBS)
- 30 min inkub. lassen
- 3 x mit Tris-NaCl waschen
- 100 μ l des jeweiligen 2. Antikörpers:
 - Rabbit Anti Maus Ig Peroxidase konjugiert
 - 70 % PBS + 30% Humanserum + 1:50 Antikörper
- 30 min inkubieren lassen
- 3 x mit Tris/NaCl waschen
- Objektträger 10 min in PBS stellen
- 1 DAB-Tablette (Sigma, München) und 1 H_2O_2 Tablette in 1 ml Leitungswasser lösen

10

15

20

25

30

- 100 µl Substrat auf die Objekträger pipettieren und für 10 min inkubieren lassen
- mit H₂O dest. spülen
- Objektträger für 5 min in Hämalaun stellen
- 15 min fließend wässern
- Objektträger in H₂O dest. stellen und mit Glyceringelatine eindexen

10

Immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelfärbung

15

20

25

Die indirekte Immunfluoreszenz Methode dient der Darstellung verschiedener Antigene auf einem Präparat. 4µm dicke Schnitte von kryokonserviertem humanem lymphatischem Gewebe werden 10 min mit Aceton fixiert. Die Färbung verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die Kryoschnitte für jeweils 30 min mit einem murinen anti Idiotyp-Antikörper als Primärantikörper und einem FITC konjugiertem rabbit anti mouse Antikörper (1:40 in PBS, pH 7,3) als Sekundärantikörper beschickt. Es folgt eine 60 minütige Inkubation mit einem unkonjugierten rabbit anti mouse Antikörper (1:50 in PBS, pH 7,3) um freie Bindungsstellen des ersten Antikörpers abzusättigen. Im zweiten Schritt werden als Primärantikörper Pan-B-lymphocyte (1:50 in PBS, pH 7,3), mouse anti CD5 (1:50 in PBS, pH 7,3) oder mouse anti human IgM (1:100 in PBS, pH 7,3) und als Sekundärantikörper ein TRITC konjugierter rabbit anti mouse Antikörper (1:20 in PBS, pH 7,3) auf die Kryoschnitte pipettiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Präparate 15 min mit PBS, pH 7,3 gewaschen. Die Präparate werden mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Weitere Merkmale der Erfindung lassen sich den nachfolgenden Beispielen entnehmen. Die besprochenen experimentellen Ergebnisse sollen die Erfindung jedoch nur erläutern und nicht einschränken.

5

Durch das in Figur 1 gezeigte Experiment wurde der immunologische Ursprung des gering mutierten, nicht affinitätsgereiften Antikörpers SC-1 durch die Generierung eines murinen monoklonalen anti SC-1-Idiotyp-Antikörpers charakterisiert. Durch Immunisierung von BALB/C Mäusen mit affinitäts-gereinigtem SC-1-Antikörper und anschließender Immortalisierung der Milzlymphozyten konnte ein monoklonaler IgG1 Mausantikörper gewonnen werden, der ausschließlich mit dem SC-1 IgM reagiert. Eine ausführliche ELISA Analyse mit unterschiedlichen kommerziellen und eigenen IgM-Antikörpern gab keinerlei Hinweis der Kreuzreaktion mit anderen Immunglobulinen. Durch immunhistochemische Doppelfärbung mit dem anti Idiotyp-Antikörper und einem anti-CD5-Antikörper konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Zellen, welche durch den anti Idiotyp-Antikörper erkannt werden, um CD 5+ B-Lymphozyten handelt.

10

15

20

25

In Figur 1 ist eine Immunfluoreszenz Doppelfärbung gezeigt. Die fluoreszierende Zelle wird sowohl von dem anti Idiotyp-Antikörper (Fig. 1 A) als auch von dem rabbit anti human IgM-Antikörper (Fig. 1 B) erkannt. Fig. 1 C, D zeigen das Ergebnis der Immunfluoreszenz Doppelfärbung mit dem anti SC-1-Idiotyp-Antikörper und einem anti-CD5-Antikörper. Die beiden vom anti Idiotyp-Antikörper (Fig. 1C) markierten Zellen werden auch von dem anti-CD5-Antikörper (Fig. 1D) erkannt. Folglich handelt es sich bei den Zellen, welche durch den anti SC-1-Idiotyp-Antikörper erkannt werden, um CD5+ B-Lymphozyten.

30

Des weiteren konnte durch die in Figur 2 gezeigte immunhistochemische Untersuchungen mit dem anti SC-1-Idiotyp-Antikörper auf normalen lymphatischen Geweben nachgewiesen werden, dass es sich bei SC-1 um einen nicht nur vom autologen Organismus, sondern um einen auch von gesunden Menschen gebildeten Idiotyp handelt. In Figur 2 kann man erkennen, dass sowohl die autologe SC-1-Milz als auch die Milz eines SC-1-negativen Magenkarzinompatienten sowie die Milz eines gesunden Probanden eine Expression des Idiotyps zeigt. Da SC-1 nicht nur auf lymphatische Organen von Karzinompatienten exprimiert wird, sondern auch von gesunden Probanden handelt es sich bei SC-1 demnach um einen Antikörper, der im Rahmen der „first line of defense“ von Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert wird.

Die einzelnen Abbildungen der Immunperoxidase-Färbung zur Analyse der Expression des anti Idiotyp-Antikörpers auf lymphatischem Gewebe in Figur 2 zeigen: A: negativ-Kontrolle auf autologer Milz. B: anti SC-1-Idiotyp-Antikörper auf autologer Milz. C: anti SC-1-Idiotyp-Antikörper auf der Milz eines Magen-karzinompatienten dessen Karzinom das von SC-1 erkannte Antigen nicht exprimiert. D: anti Idiotyp-Antikörper auf der Milz eines Gesunden.

Patentansprüche

5

1. Anti Idiotyp-Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, dass der anti Idiotyp-Antikörper
 - den humanen monoklonalen SC-1 Antikörper oder
 - Fragmente des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers spezifisch bindet.

10

2. Anti Idiotyp-Antikörper nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der anti-Idiotyp SC-1-Antikörper spezifisch an CD 5 positive B-Lymphozyten bindet.

15

3. Anti Idiotyp-Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der anti Idiotyp-Antikörper von Hybridomzelllinie, die am 06. November 2003 mit der Bezeichnung „6/22-10-20-13“ bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig hinterlegt wurde, experimentiert wird.

20

4. Die Hybridomzelllinie mit der Zugangsnummer, die am 06. November 2003 mit der Bezeichnung „6/22-10-20-13“ bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig hinterlegt wurde.

25

30

5. Anti Idiotyp-Antikörper gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der anti Idiotyp-

Antikörper nach dem in Ansprüchen 6 bis 19 beanspruchten Verfahren generierbar ist.

5

6. Verfahren zur Generierung eines anti Idiotyp-Antikörpers aus der Maus oder aus der Ratte durch Einsatz entsprechender Hybridom-Zellen erster Generierung, hergestellt durch Fusion von B-Lymphozyten mit Myelom-Zellen erster Generierung, wobei die kultivierten Hybridom-Zellen erster Generierung jeweils monoklonale humane IgM-Antikörper exprimieren, **dadurch gekennzeichnet**, dass

10

15

20

25

30

- die flüssigen Überstände der kultivierten Hybridom-Zellen erster Generierung zur Isolation der monoklonalen humanen IgM-Antikörper gereinigt werden,
- Mäuse oder Ratten mit dem gereinigten monoklonalen humanen IgM-Antikörper immunisiert werden,
- die für die nachfolgende Generierung isolierten B-Lymphozyten der bis zu vier Tagen nach der letzten Immunisierung getöteten Mäuse oder Ratten isoliert werden,
- die isolierten B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit Myelomzellen der Maus oder der Ratte unter Bedingungen in Kontakt gebracht werden, die zu einer Fusion führen aus der die Hybridom-Zellen der nachfolgenden Generierung hervorgehen
- die Hybridomzellen der nachfolgenden Generierung kultiviert werden,
- die flüssigen Überstände der monoklonalen Hybridom-Zellenkulturen der nachfolgenden Generierung nach bestimmter Inkubationszeit auf die Anwesenheit von idiotypen Ig-Antikörpern getestet werden,

- die in den flüssigen Überstände der kultivierten Hybridom-Zellen der nachfolgender Generierung enthaltenen idiotypen Ig-Antikörper-auf ihre spezifische Bindung an den von den Hybridomzellen erster Generierung expremierten humanen monoklonalen Antikörper getestet werden, und
- die in den flüssigen Überstände der kultivierten Hybridom-Zellen der nachfolgenden Generierung enthaltenen idiotypen Ig-Antikörper-auf ihre spezifische Bindung an verschiedene IgM-Antikörpern hin untersucht werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die B-Lymphozyten erster Generierung humanen Ursprungs sind und einem lymphatischen Organ, vorzugsweise der Milz oder des Lymphknotens oder dem Blut eines Karzinompatienten entnommen sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hybridom-Zellen erster Generierung den humanen monoklonalen SC-1-Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon exprimieren und sezernieren und deren Aminosäuresequenz substantiell übereinstimmt mit der bekannten Aminosäuresequenz des humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers (Vollmers et al., Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer, Oncology Reports 5: 35-40, 1998).

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die funktionellen Fragmente des humanen mono-

klonalen SC-1-Antikörpers (mindestens) einer der V_L V_H , Fv, Fc, Fab, Fab', F(ab')₂ Gruppen angehört.

5

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass Reinigung der IgM-Hybridom-Überstände erster Generierung zur Isolation der humanen monoklonalen Antikörper durch

- Affinitätschromatographie, oder/ und
- Ionenaustauschchromatographie oder/ und
- Gelfiltration erfolgt.

10

15

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Immunisierung der Tiere durch den humanen monoklonalen SC-1-Antikörper, dessen Aminosäuresequenz bekannt (Vollmers et al., Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer, Oncology Reports 5: 35-40, 1998) ist, erfolgt.

20

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Immunisierung der Tiere vorzugsweise durch intraperitoneale Injektion des gereinigten humanen monoklonalen SC-1-Antikörpers erfolgt.

25

30

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass für die Generierung muriner anti SC-1 idiotyper-Antikörper BALB/c Mäuse mit gereinigtem humanen monoklonalen SC-1-Antikörper immunsiert werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Immunisierung einem festgelegten Immunisierungsschema folgt.

5

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fusion der aus der Maus gewonnenen B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit den Myelomzellen der Maus in Polyethylenglykol (PEG) erfolgt.

10

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass für die Gewinnung von Hybridomzellen zweiter Generierung zur Isolierung muriner anti SC-1-Idiotyper Antikörper die vorzugsweise aus BALB/c Mäusen gewonnenen B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit NS-O Myelomzellen der Maus in Polyethylenglykol (PEG) fusioniert werden.

15

20

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Gewinnung von anti SC-1-Idiotyp-Antikörpern der Ratte die Fusion der aus der Ratte gewonnenen B-Lymphozyten einer nachfolgenden Generierung mit Myelomzellen der Ratte in Polyethylenglykol (PEG) erfolgt.

25

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die herangewachsenen Hybridomzellen einer nachfolgenden Generierung unter Einsatz eines enzyme-linked-

30

immunosorbent-assays (ELISA) auf Produktion muriner Ig Antikörper getestet werden.

5 19. Verfahren nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass die ELISA Assays nach 2, 3, 4 oder 5 Wochen durchgeführt werden.

10 20. Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen.

15 21. Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Durchführung FACS-Analysen mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters.

20 22. Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Durchführung pharmakokinetischer Tests zum spezifischen Nachweis des entsprechenden humanen Antikörpers in Blutseren.

25 23. Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 zur Vakzination.

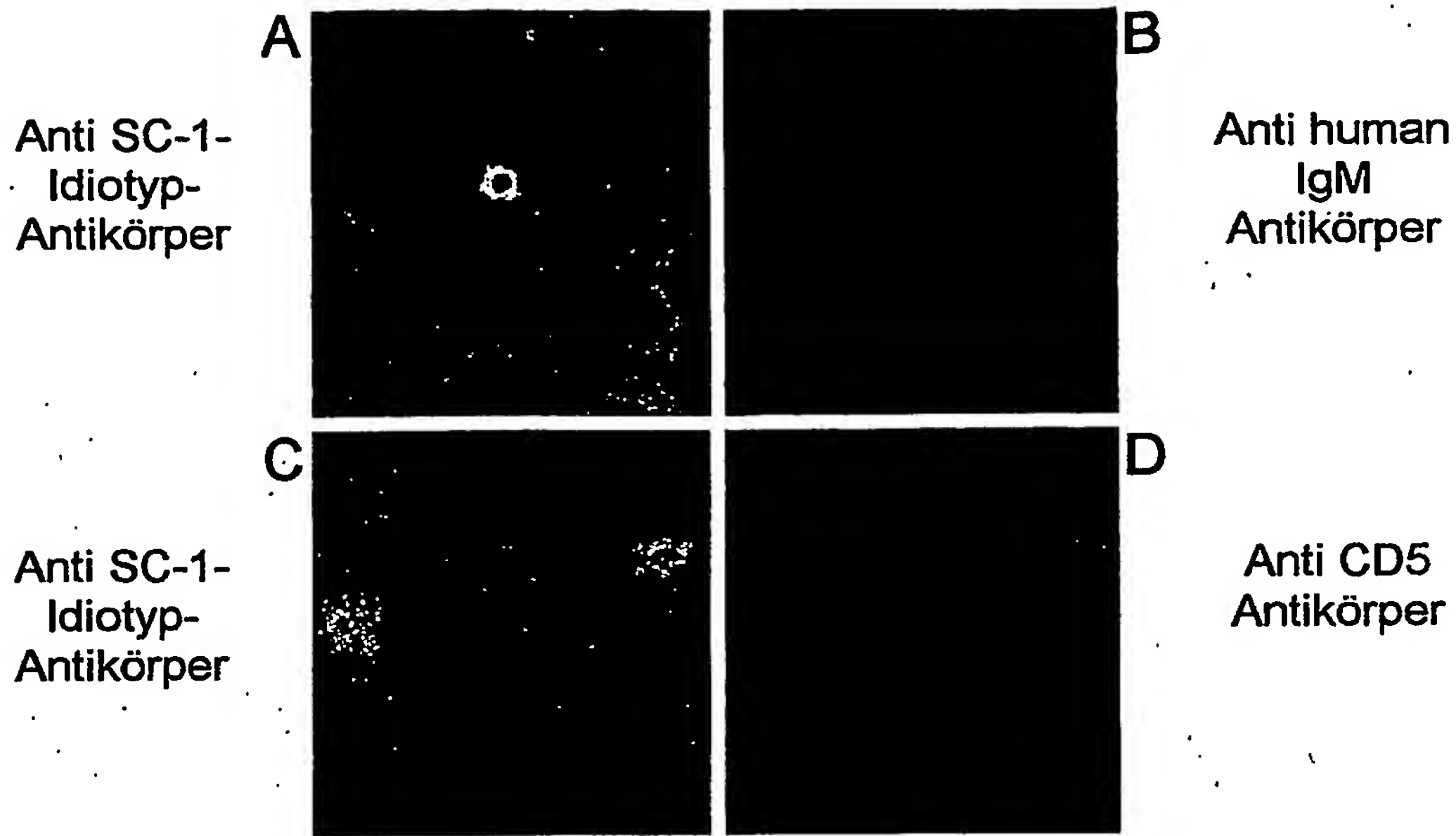
Zusammenfassung

5

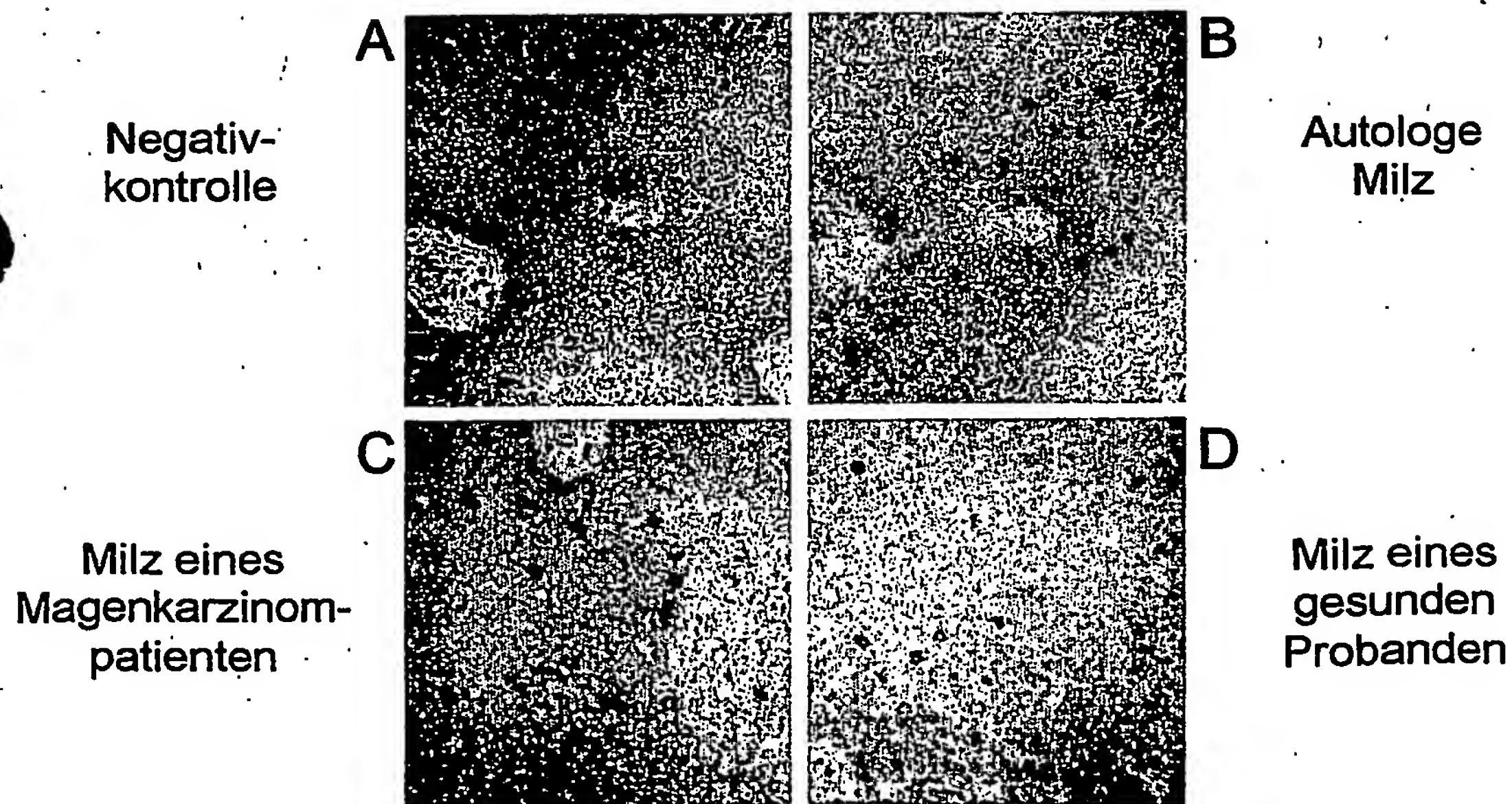
Anti Idiotyp-Antikörper, der den humanen monoklonalen SC-1. Antikörper oder Fragmente des humanen monoklonalen SC-1 Antikörpers spezifisch bindet, sowie die Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers für Forschungs- und Diagnosezwecke, sowie die Verwendung des anti Idiotyp-Antikörpers einer Herstellung von Zubereitung durch das biochemische und pharmazeutische Gewerbe.

131103

26



Figur 1



Figur 2

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IB2004/004407

International filing date: 15 November 2004 (15.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10352977.2
Filing date: 13 November 2003 (13.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 05 April 2006 (05.04.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not
in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.